

Structure-Function Relationships of Cytochrome P450 and Neuronal Nitric Oxide Synthase

著者	佐藤 秀明
号	42
学位授与番号	1133
URL	http://hdl.handle.net/10097/38693

氏名・(本籍)	さ　　とう　　ひで　　あき 佐　藤　秀　明
学位の種類	博　士(理　学)
学位記番号	理第1133号
学位授与年月日	平成11年3月3日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
研究科, 専攻	平成7年3月24日　東北大学大学院理学研究科(博士課程前期2年の課程) 化学第二専攻修了
学位論文題目	Structure-Function Relationships of Cytochrome P450 and Neuronal Nitric Oxide Synthase (シトクロム P 450 及び神経型一酸化窒素合成酵素の構造と機能)
論文審査委員	(主査) 教授 清水　　透 教授 藤井義明, 古山種・俊 講師 佐上郁子

論　文　目　次

Chapter 1	Introduction
Chapter 2	Effect of Putative Surface Mutations on the Catalytic Activities of Cytochrome P450 1A2
Chapter 3	Effect of Ligands on O-O Bond Cleavage Reactions of Cumyl Hydroperoxide with the Wild-Type Cytochrome P450 1A2
Chapter 4	CO Binding Studies of Neuronal Nitric Oxide Synthase
Chapter 5	Autoxidation Rates of Neuronal Nitric Oxide Synthase
Chapter 6	Resonance Raman Studies of CO-bound Neuronal Nitric Oxide Synthase
Chapter 7	Summary

論文内容要旨

第1章 序論

シトクロムP450(P450)は、多くの有機化合物の一酸素原子添加反応を触媒する、一群のヘム酵素である。P450の触媒反応には、NADPH-シトクロムP450還元酵素と分子状酸素が必要である。しかし、過酸化物の存在下では、還元酵素や分子状酸素がなくとも反応を触媒する。過酸化物はP450により、2つの異なったO-O結合開裂機構（均一開裂または不均一開裂）を経て分解される。過酸化物-P450反応系でのO-O結合開裂は、通常反応系でのO-O結合開裂を考える上で、よいモデル系として用いられてきた。

シトクロムP450 1A2(P450 1A2)は、アフラトキシン等の発癌活性化に関与する重要な酵素である。すべてのP450間でよく保存されている、P450 1A2のイオン性アミノ酸Lys250, Arg251, Lys253は、可溶性のP450camの結晶構造よりこの酵素の基質認識部位と軸配位子接近チャンネルの近傍に位置すると推定される。過酸化物や分子状酸素のO-O結合開裂におけるこれらの残基の役割を理解するために、これらのアミノ酸の変異体を用い、7-エトキシマリニン(7-EC)O-脱エチル化とメタノール水酸化に与える効果について検討した。また、種々の配位子が、P450 1A2による過酸化物のO-O結合開裂に与える影響についても検討した。

一方、P450型のヘム活性部位をもつオキシゲナーゼドメインと、NADPH-シトクロムP450還元酵素類似の還元酵素ドメインからなる一酸化窒素合成酵素(NOS)は、生体内でL-アルギニン(L-Arg)を基質として一酸化窒素(NO)を合成し、NOによる多くの重要な生理作用に寄与する。NO合成に必要な一酸素原子添加反応における酸素分子の活性化は、NOSのヘム遠位で起こると推定され、L-Argから中間体N-ヒドロキシ-L-アルギニン(NHA)への酸化反応は、P450同様の機構で考えられる。しかし、次のNHAからL-シトルリンとNOへの反応は、P450とは異なった経路で進む可能性が示唆されている。

NOSのヘム活性部位の構造と興味深い酸素活性化の機構について理解するために、基質や種々の阻害剤、補因子の存在下、神経型NOS(nNOS)ヘムのCO結合に関する研究や自動酸化の研究、CO-結合型NOSの共鳴ラマン分光法による研究を行なった。

第2章 シトクロム P450 1A2 の触媒活性における推定表面変異の効果

7-ECO-脱エチル化とメタノール水酸化の各種動力学パラメータが、NADPHと還元酵素からなる再構成系と、*tert*-ブチルヒドロペルオキシド (TBHP)系において、推定表面変異(Lys250Leu, Arg251Leu, Lys253Leu)によってどう影響されるかを調べた。7-ECに対する K_m は、再構成系、TBHP系共にこれらの変異により著しく減少した。これは、変異により疎水性が増したためであると推定される。また、メタノール水酸化反応における K_m に対する変異の効果は、両反応系において7-ECの場合とは異なっていた。これらの2つの基質に関して、基質結合部位と接近チャンネルが正確に同じではないことが示唆される。これらの反応において観測された K_m と k_{cat}/K_m より、Lys250, Arg251, Lys253からなるイオン性の領域、特にArg251は、P450 1A2の疎水性基質認識部位の近傍に位置していることが示唆された。

P450触媒反応のO-O結合開裂機構を解明するために、野生型及び変異型P450 1A2とTBHPやクミルヒドロペルオキシド(CHP)といった過酸化物との相互作用を、分光学的解析と生成物分析によって詳細に研究した。吸収スペクトルでは、野生型の393 nmのソーレー帯の吸収が、TBHPやCHPの添加により減少した。一方、CHPの添加による変異体の吸収変化は、420 nm周辺に新しいバンドの出現を伴った。Arg251Leu変異体においては、TBHPやCHPによって起こるスペクトル変化が他の変異体と著しく異なった。CHPのO-O結合開裂反応の生成物分析によると、変異体のArg251LeuとLys253Leuは、O-O結合均

一開裂を著しく増加させ、野生型の約2倍量のアセトフェノンを生成した。Arg251Leu変異とLys253Leu変異は、ヘム環境を特徴的な構造に誘導し、CHPのO-O結合開裂に間接的に影響する可能性が示唆された。これらの結果は、遠位側の環境が、過酸化合物-P450複合体のO-O結合開裂に影響するという考えを支持している。

第3章 野生型シトクロム P450 1A2 によるクミルヒドロペルオキシドのO-O結合開裂反応における配位子の効果

P450 1A2によるCHPのO-O結合開裂に対する、アルコールやイミダゾール類のような配位子と7-ECの効果、生成物分析と分光学的解析で調べた。アルコールが存在すると、CHPのO-O結合不均一開裂の促進によりクミルアルコール生成が著しく増大したことから、アルコールの水酸基のプロトンによる攻撃の可能性が示唆された。2-メチルイミダゾールは、P450 1A2によるCHP分解速度とスペクトル変化速度に影響を与えなかった。これは、P450 1A2への2-メチルイミダゾールの結合性が非常に低いと推定された。4-メチルイミダゾールは、CHPの分解とスペクトル変化を著しく妨げた。これは、ヘム鉄に対するこの配位子の直接の配位によるものと思われる。7-ECも、P450 1A2とCHPとの反応を妨げた。これは、7-ECが遠位のアミノ酸と相互作用し、CHPとP450 1A2のヘム鉄との接近を妨害して、CHP分解反応を阻害したためであると推定された。

第4章 神経型一酸化窒素合成酵素のCO結合に関する研究

L-ArgやNOS阻害剤、H₄Bの存在下でnNOSヘムへのCO結合について研究した。基質や阻害剤、補因子の非存在下、COの解離定数K_dは1 nM以下であった。基質が存在するとき、K_dは1 μMまで増加した。NAMEやNIのような阻害剤の存在下、K_dは100 μM以上に増加した。NMMAやNIL, TC, DICのような他のNOS阻害剤やP450の基質となる多環式芳香族炭化水素も、K_dを増加させた。H₄Bの添加は、L-ArgやP450基質の存在下で、K_dをさらに増加させた。一方、NIとDICの存在下、H₄BはK_dを減少させた。このことから、NIはヘム活性部位から遠くに結合するが、H₄Bの存在下でCO結合を促進することが示唆された。

NOSへのCOの再結合速度定数k_{on}は0.21 μM⁻¹s⁻¹であるが、これはL-ArgやNILの添加により30分の1以下に減少した。一方、P450の基質を添加しても、目立った効果はなかった。H₄Bの共存は、L-ArgやNILの存在下でk_{on}を2倍以上に増加させたが、TCの存在下では3分の1まで減少させた。これらの結果より、阻害剤共存時のH₄Bの添加が、常に「閉じた」ヘム遠位構造を誘導するわけではないことが示唆された。

第5章 神経型一酸化窒素合成酵素の自動酸化速度

L-Argや様々な因子の存在下、ストップフロー法によりnNOSヘムの自動酸化を検討した。吸収変化曲線の解析より、この自動酸化は3つの相(60 s⁻¹ (28%), 5.5 s⁻¹ (11%), 0.048 s⁻¹ (61 %))より成ることがわかった。基質やその類似体とDICは、H₄Bの非存在下で自動酸化速度を減少させるが、この効果はNHAの場合を除き、H₄Bの存在により弱められた。この結果より、L-Argは、酸素結合型nNOS複合体を安定化して、効率の良いO-O結合開裂を引き起こすのに重要である可能性が示唆された。一方、H₄BはL-Argとは異なった様式でその複合体に作用すると推定された。また、NHAはH₄B存在下でさえも自動酸化の第1相の速度を著しく減少させた。これは、NHAの一酸素原子添加反応におけるO-O結合開裂の機構が、L-Argの場合と異なっていることを示唆している。さらに、カルモジュリンやH₄BはNOS全体の構造をより堅固にし、DICはH₄Bが存在時でもより柔軟にすることが示唆された。

第6章 COの結合した神経型一酸化窒素合成酵素の共鳴ラマンスペクトルによる研究

COの結合した還元型nNOSについて、基質や阻害剤、補因子の存在下、共鳴ラマンスペクトルを測定した。CO-nNOS複合体の、鉄-CO伸縮振動に対応する共鳴ラマンのバンドは493 cm^{-1} に位置しており、基質や阻害剤の添加により4 cm^{-1} 以上高波数側にシフトした。しかし、このバンドに対する H_2B の効果は大きくなかった。ヘム遠位の構造は、基質や阻害剤により大きく影響されることが確認された。L-Argとその類似体が存在する場合、NOSのヘム遠位構造は基質なしの時とは異なるものであると推定された。

第7章 総括

P450 1A2のLys250, Arg251, Lys253の3つのイオン性残基は、分子表面にある基質結合部位の近くに位置していることが示唆された。また、イオン性の変異による遠位の構造変化が、過酸化物のO-O結合開裂に影響を与えることが示された。さらに、アルコールやイミダゾールのような配位子が、P450 1A2による過酸化物のO-O結合開裂に著しい効果を示すことが示唆された。

また、nNOSのCO結合、自動酸化、共鳴ラマンスペクトルの研究から、基質や各種阻害剤、補因子の存在が、ヘム活性部位の構造に著しい影響を与えることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

本論文は、多くの有機化合物の一酸素原子添加反応を触媒する一群のヘム酵素であるシトクロム P450(P450)による過酸化物や分子状酸素のO-O結合開裂における、分子表面に存在するアミノ酸残基の役割を理解することを目的とした。まず、これらのアミノ酸の変異体を用い、7-エトキシクマリンO-脱エチル化とメタノール水酸化に与える効果について検討し、また、種々の配位子が、P450 による過酸化物のO-O結合開裂に与える影響についても検討したものである。さらに、P450型のヘム活性部位を持つ一酸化窒素合成酵素(NOS)のヘム活性部位の構造と酸素活性化の機構について理解することを目的とした。そのために、基質や種々の阻害剤、補因子の存在下、神経型NOS(nNOS)のヘムへのCO結合に関する研究や自動酸化速度の研究、CO-結合型nNOSの共鳴ラマン分光法による研究を行なったものである。

これらの研究から、P450 1A2のLys250, Arg251, Lys253からなるイオン性の領域、特にArg251は、P450 1A2の分子表面にあって、疎水性基質認識部位の近傍に位置していることが示唆された。また、イオン性アミノ酸の変異により引き起こされた遠位の構造変化が、過酸化物のO-O結合開裂に著しい影響を与えることが示された。さらに、アルコールやイミダゾールのような配位子が、P450 1A2による過酸化物のO-O結合開裂に著しい効果を示すことが示唆され、これら配位子のO-O解裂反応における役割を明らかにした。

また、神経型NOS(nNOS)のCO結合、自動酸化、共鳴ラマンスペクトルの研究から、基質や各種阻害剤、補因子はヘムに関連した物理化学的パラメータを大きく変化させ、このことから、これらがヘムの遠位側に存在すること、及びこれらが、ヘム活性部位の構造に著しい影響を与えることを明らかにした。

これ等の研究成果は博士論文として適当であり、本人が自立して研究活動を行うのに必要な高度の研究能力と学識を有することを示している。したがって、佐藤秀明提出の論文は、博士(理学)の学位論文として合格と認める。